贺兰山野生大型真菌孢子多样性分析①

卢　玲[1,2]，　云兴福[1]，　吕世杰[1]
（1. 内蒙古农业大学农学院，内蒙古 呼和浩特　010018；
2. 内蒙古科技大学包头师范学院，生物科学与技术学院，内蒙古 包头　014030）

摘　要：为探讨贺兰山野生大型真菌孢子的多样性，2012—2016 年在内蒙古贺兰山南寺和哈拉乌沟两地进行取样，每个样地分别由 5 人从沟谷入口处进行拉网式调查，共获得 4 000 余份样品，经过微观形态观察和基因 ITS 序列比对，鉴定出 8 目 25 科 69 属 189 种大型真菌，主要对其孢子形态特征、表面特征及长宽比进行分析，得到如下结论：质量性状上，孢子形态特征和表面特征相互独立；数量性状上，大小孢子长宽比、孢子极端比和平均比均具有一致性和关联性，显示孢子数量特征的稳定性；菌种间孢子质量性状和数量性状具有很强的多样性；按照孢子多样性低、中、高分类，贺兰山野生大型真菌物种数分别为 152 种、26 种和 11 种；孢子多样性分类为大型真菌鉴别、分类提供了基本依据。

关键词：孢子形态；大型真菌；多样性；贺兰山

随着生物技术的不断发展，物种鉴定方法也不断更新，经历了形态学鉴定、细胞水平鉴定、生化分析鉴定、免疫学鉴定、分子标记鉴定等几个阶段。大型真菌的科学分类是基于子实体宏观和微观特征建立的，简单而直观。但 DNA 水平的研究证明，并不是所有的直观都是正确的，一些形态上相距甚远的物种事实上亲缘关系很近，而一些形态上相近的物种其亲缘关系却较远，众所周知的马勃属（*Lycoperdon*）的物种和栽培的双孢蘑菇（*Agaricus brunnescens*）属于同一个科，如果仅仅观察子实体或微观结构，不能发现它们的亲缘关系这样近[1]。李玉等[2]认为，利用新科技开展研究本无可厚非，传统科学不断融入新的技术更是历史的必然。大型真菌的子实体形状和孢子释放的方式虽不尽相同，但产孢机理基本上是一样的，孢子是微小的，数以百万计地生长在产孢组织上，孢子的形态观察是孢粉学主要研究对象，能够为大型真菌的分类、组合、进化以及时间和空间上的分布提供依据[3-4]。孢子的形态结构特征中有大量演化的信息，孢粉学研究能否为大型真菌系统分类提供依据的关键在于发现和识别孢子的特征并从中提取有用的信息。目前，传统的光学显微镜观察结果，结合扫描电子显微镜对孢粉表面纹饰的观察和透射电镜对孢粉壁超微结构所作的观察，可以揭示出孢子外部和内部的更为详细准确的形态结构特征[5]。国内的大型真菌学科领域针对孢子的研究主要集中于形态、大小、萌发孔的位置和孢子表面纹饰描述等方面，而基于某一地区全部或大部分的大型真菌孢子形态特征和数量特征的统计比较与分析鲜有报道。贺兰山坐落于银川平原和阿拉善高原之间，独特的地理位置和地形地貌孕育着多种大型真菌[6]。野生大型真菌不仅自身表现出形态多样性、生境多样性，还表现出与其他物种的种间关系多样性。孙丽华等[7-9]对贺兰山野生大型真菌多样性进行了系统研究，着重调查了本区域的大型真菌物种组成和分布的地理区系特点，但缺少基于菌种调查后分子学的鉴定和孢子多样性的进一步分析。据王小明等[10]统计宁夏贺兰山大型真菌有 12 科，52 属，210 种；刘振生等[11]统计内蒙古贺兰山大型真菌统计有 7 目，27 科，79 属，262 种。本研究将内蒙古贺兰山大型真菌在分子水平 ITS 序列比对的基础上，确定其属、种分类地位，采集其孢子的形态特征和表面特征，测定孢子长度和宽度并计算长宽比，采用质量性状分析方法探讨孢子多样性规律，从而对贺兰山大型真菌的多样性进行系统分析。

① **收稿日期：**2019－01－16；　**修订日期：**2019－03－20
基金项目：国家自然科学基金（31560655）资助
作者简介：卢玲（1975－），女，博士研究生，主要从事大型真菌的分类与鉴定研究. E-mail：ivy353189205@outlook.com
通讯作者：云兴福. E-mail：yxf5807@163.com

旨在为大型真菌多样性研究提供理论依据，并为大型真菌种质资源的保护与利用提供数据支撑。

1 材料来源与研究方法

1.1 研究区概况

研究区主要集中于内蒙古贺兰山南寺(38°37′28″~38°43′48″N,105°48′32″~105°53′43″E)和哈拉乌沟(38°50′34″~38°53′21″N,105°52′31″~105°57′15″E)两地，海拔均为1 950~2 650 m。属于典型的大陆性气候，年平均气温6.90~8.00 ℃，年降水量130.20~395.60 mm，且主要集中在6—9月。植被类型包括荒漠草原及草原带、灌丛带、针叶林带以及亚高山灌丛和草甸带。土壤类型较为复杂，主要包括灰褐土、栗钙土和棕钙土等。由于土壤条件、植被类型及温湿度的复杂性，形成了贺兰山大型真菌的多样性分布特点，其中主要大型真菌有蘑菇属 *Agaricus* 的林地蘑菇 *A. silvaticus* Schaeff.；丝膜菌属 *Cortinarius* 的紫红丝膜菌 *C. rufoolivaceus*(Pers.) Fr.；乳菇属 *Lactarius* 的松乳菇 *L. delicious* (L.) Gray 和窝柄黄乳菇 *L. scrobiculatus* (Scop.:Fr) Fr.，枝瑚菌属 *Ramaria* 的变绿枝瑚菌 *R. abietina* (Pers.:Fr.) Quél.，马勃属 *Lcoperdaon* 的网文马勃 *Lyoperdon perlatum* Pers.，秃马勃属 *Calvatia* 的大秃马勃 *Calvatia gigantea* (Batsch) Lloyd，地星属 *Geastrum* 的尖顶地星 *G. triplex*(Jungh.) Fisch. 等。

1.2 材料来源及取样方法

试验材料于2012—2016年每年7—9月分别在贺兰山南寺和哈拉乌沟两地进行取样，每个样地5个人，从沟谷入口处进行拉网式调查，共获得4 000余份样品，在实验室进行宏观形态和微观形态的分类学鉴定，提取总DNA，进行PCR扩增，使用引物ITS1:5’-TCCGTAG GTGAACCTGCGG-3’和ITS4:5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’，得到500~750 bp的片段构建进化系统树(phylogenetic tree)，得到贺兰山大型真菌物种多样性调查结果(表1)。样本中确定8目25科69属189种大型真菌。选取各大型真菌开伞成熟的子实体在1 000倍光学显微镜下对孢子形态特征和表面特征进行观测并统计，鉴定标准的分类方式(表2)和孢子大小比值分类(表3)都按照王向华等[12]对云南野生商品蘑菇孢子的描述进行。每种菌种测定20个成熟孢子的长、宽并记录，按长径分为大孢子组和小孢子

表1 内蒙古贺兰山大型真菌分类调查鉴定结果

Tab. 1 Classification and identification of macrofungi in Helan Mountain in Inner Mongolia

目	科	属数	物种数
非褶菌目 Polyporales	皱皮孔菌科 Meruliaceae	1	1
	齿菌科 Hydnaceae	2	2
	多孔菌科 Polyporaceae	14	22
	韧革菌科 Stereaceae	1	2
	枝瑚菌科 Ramariaceae	1	2
红菇目 Russulales	红菇科 Russulaceae	2	3
鬼笔目 Phallales	地星科 Geastraceae	1	3
蜡钉菌目 Helotiales	地舌菌科 Geoglossaceae	1	1
马勃菌目 Lycoperdales	马勃科 Lcoperdaceae	2	13
盘菌目 Pezizales	马鞍菌科 Helevllaceae	1	6
	盘菌科 Pezizaceae	6	7
伞菌目 Agaricales	白蘑科 Tricholomataceae	10	40
	侧耳科 Pleurotaceae	2	3
	粉褶菌科 Entolomataceae	1	1
	鬼伞科 Coprinaceae	2	3
	蜡伞科 Hygrophoraceae	1	2
	铆钉菇科 Gomphidiaceae	2	2
	蘑菇科 Agaricaceae	5	27
	牛肝菌科 Boletaceae	3	9
	球盖菇科 Strophariaceae	3	4
	丝膜菌科 Cortinariaceae	3	31
	小皮伞科 Marasmiaceae	2	2
	锈耳科 Crepidotaceae	1	1
	锈伞科 Bolbitiaceae	1	1
银耳目 Tremellales	银耳科 Tremellaceae	1	1

表2 孢子形态特征及孢子表面特征分类依据

Tab. 2 Classification of spore morphological and surface characteristics

形态特征	孢子形态特征编码	表面特征	孢子表面特征编码
形态特征	1	光滑	1
椭圆形	2	具小疣	2
卵形(宽椭圆形)	3	具麻点	3
长椭圆形	4	具网状	4
球形	5	具小刺	5
线性	6	棱纹	6
三角形	7	小柄	7
长梭形	8	具小瘤	8
柠檬形	9	瘤状小刺	9
杏仁形	10	基部有尖凸	10
纺锤状	11	-	-
球状多角形	12	-	-
不规则	13	-	-
圆柱形	14	-	-
肾形	15	-	-
圆筒形	16	-	-
长方形	17	-	-
广椭圆形	18	-	-

表 3　孢子大小比值分类依据

Tab. 3　Classification basis of spore size ratio

编码	比值范围			
	大孢子长宽比	小孢子长宽比	平均比	极端比
1	$1.00 \leq L/W < 2.00$	$1.00 \leq L/W < 2.00$	$1.00 \leq (Max/Min) < 1.15$	$1.00 \leq L/W < 2.00$
2	$2.00 \leq L/W < 3.00$	$2.00 \leq L/W < 3.00$	$1.15 \leq (Max/Min) < 1.25$	$2.00 \leq L/W < 3.00$
3	$3.00 \leq L/W$	$3.00 \leq L/W$	$1.25 \leq (Max/Min)$	$3.00 \leq L/W$

组,长径前 10 位的为大孢子组,长径后 10 位的为小孢子组。对孢子比值(大孢子长宽比、小孢子长宽比、平均比和极端比)进行编码,编码 1、2、3 分别代表比值范围为 1(1) ~2(1.15)、2(1.15) ~3 (1.25), 3(1.25) ~ ∞ (表 3)(括号内为平均比的编码依据)。其中,大孢子长宽比 L/W = 最大孢子长度/最大孢子宽度;小孢子长宽比 L/W = 最小孢子长度/最小孢子宽度;平均比 Max/Min = 大孢子平均直径/小孢子平均直径;极端比 L/W = 最大孢子长度/最小孢子宽度。

使用奥林巴斯 BX53 研究级显微镜,数据测量使用奥林巴斯载物台测微计 OBM1/100 进行校准,执行标准:ISO 9001:2015,证书号:PM553994。

1.3　数据分析

聚类分析是从样本数出发,将每个个体看作一类,把相似程度较大的数据或属性聚合为一类 ,把彼此之间相似程度较大的样品聚合为另一类 ,关系密切的聚合到一个小的分类单位,关系疏远的聚合到一个大的分类单位,直到所有数据或属性都聚合完毕,把不同的类型划分出来[13-14]。

对贺兰山野生大型真菌孢子的形态特征和表面特征依据表 2 统计物种数及其占总物种数的百分比进行列联表分析[15];对大孢子长宽比和小孢子长宽比、平均比和极端比依据表 3 统计物种数及其占总物种数的百分比并进行一致性和列联表分析;最终将所有编码值汇总,进行 *K*-means 聚类分析和贝叶斯(Bayes)判别分析[16]。所有数据分析均在 Excel 2010 和 SAS 9.2 中进行。

2　结果与分析

2.1　孢子形态及表面特征的多样性

孢子形态及表面特征分析结果见表 4,孢子形态特征出现频次百分比大于 10% 的编码分别是 1、2 和 4。对应表 1 可知,大型真菌孢子形态主要以椭圆形、卵形和球形为主,出现频数百分比依次为

表 4　孢子形态及表面特征的多样性

Tab. 4　Diversity of spore morphology and surface characteristics

特征编码	孢子形态特征		孢子表面特征	
	物种数	百分比/%	物种数	百分比/%
1	88	46.56	136	71.96
2	55	29.10	38	20.11
3	9	4.76	13	6.88
4	46	24.34	2	1.06
5	1	0.53	5	2.65
6	1	0.53	1	0.53
7	4	2.12	2	1.06
8	5	2.65	1	0.53
9	4	2.12	1	0.53
10	6	3.17	1	0.53
11	1	0.53		
12	1	0.53		
13	3	1.59		
14	1	0.53		
15	1	0.53		
16	1	0.53		
17	2	1.06		
18	1	0.53		

46.56%、29.10% 和 24.34%,三者之和已经达到 100%,小于总计频率百分比 121.71%,说明大型真菌孢子形态多样性不仅存在于物种之间,也存在物种内部,即同物种大型真菌孢子存在 2 种或 2 种以上形态特征。

大型真菌孢子表面特征显示,特征编码为前 3 位的频率百分比分别是 71.96%、20.11% 和 6.88%,总和为 98.95%,而总计频率百分比为 105.84%,因此大型真菌孢子表面特征主要以光滑、具小疣和具麻点为主,且无论是物种间还是物种内均存在表型多样性。

无论是孢子形态特征还是孢子表面特征,均存在物种内多样性,种内多样性统计结果见表 5。大型真菌种内孢子形态特征显示,148 种大型真菌孢子具有 1 种形态特征,频数百分比为 78.31%,41 种大型真菌具有2个形态特征的孢子,频数百分比为

表 5　孢子形态及表面特征多样性的类别汇总

Tab. 5　Classification summary of the diversity of spore morphology and surface features

特征类型编码	孢子形态特征		孢子表面特征	
	物种数	百分比/%	物种数	百分比/%
1	148	78.31	178	94.18
2	41	21.69	10	5.29
3	–	–	1	0.53

21.69%,同时 178 种具有 1 种表面特征,频数百分比 94.18%,具有 2 种及以上的的大型真菌孢子共有 11 种(10 + 1),频数百分比 5.82%(5.29% + 0.53%)。结合表 4 和表 5 可知,大型真菌孢子的形态特征和表面特征种内多样性要远远小于种间多样性,这不仅体现于特征编码的多少,还体现在出现的物种数以及物种频次百分比。

2.2　孢子大小比值多样性

大型真菌根据测得其孢子长宽比进行分类(表 6)。大孢子和小孢子长宽比在编码内出现的大型真菌种数相同,占比分别为 80.42%、13.76% 和 5.82%。说明无论大孢子还是小孢子,其长宽比主要分布在 $1.00 \leq L/W < 2.00$ 范围内。当考虑大小孢子平均直径比(平均比)时,落入 $1.00 \leq (Max/Min) < 1.15$ 范围内的大型真菌物种占比情况仅为 18.52%;而在 $1.15 \leq (Max/Min) < 1.25$ 范围内大型真菌占比 63.49%,说明大型真菌孢子平均直径比主要集中在此区域;$1.25 \leq (Max/Min)$ 范围内大型真菌物种占比为 17.99%。表 6 得到的极端比情况显示,落入 $1.00 \leq L/W < 2.00$ 大型真菌占比为 44.44%;在 $2.00 \leq L/W < 3.00$ 范围内大型真菌占比为 42.33%;大孢子长径比小孢子宽径大于 3 的极端比值为 13.23%;说明不同大型真菌孢子大小比值在种内和种间的数量级差异比较大,集中在 $1.00 \leq L/W < 3.00$ 的范围内。

表 6　孢子大小比值的多样性

Tab. 6　Diversity of spore size ratio

长宽比编码	大孢子长宽比		小孢子长宽比		极端比		平均比	
	物种数	百分比/%	物种数	百分比/%	物种数	百分比/%	物种数	百分比/%
1	152	80.42	152	80.42	84	44.44	35	18.52
2	26	13.76	26	13.76	80	42.33	120	63.49
3	11	5.82	11	5.82	25	13.23	34	17.99

2.3　孢子形态特征与孢子表面特征的关联性

孢子形态特征和孢子表面特征的列联表见表 7。孢子形态特征为 148、41;孢子表面特征为 178、10、1。因此,孢子表面特征的集中程度(178)比孢子形态特征(148)更能反应出孢子特征的分配情况。由于表 7 中大型真菌种数存在 0 值,需要进一步转化为 2 × 2 列联表,计算卡方值,得到 $\chi^2 = 0.45 < \chi^2_{0.05} = 3.84$,因此,孢子形态特征与其表面特征不存在显著的关联性,即孢子形态变化不会引起表面特征发生变化,形态多样性与表面特征多样性相互独立,即孢子为椭圆形或宽椭圆形与表面具小尤或麻点是相互独立的。

2.4　孢子长宽比的一致性和关联性

2.4.1　大、小孢子长宽比的一致性及关联性　根据大、小孢子长宽比情况进行列联表绘制(表 8)。大、小孢子长宽比的比值具有很强的一致性,其在相同长宽比范围内均具有较高的物种数,例如大、小孢子长宽比值都在 1 号编码范围的物种数是 152,大、小

表 7　孢子形态与表面特征关联性

Tab. 7　Association of spore morphology with spore surface characteristics

孢子形态特征编码	孢子表面特征编码			总计
	1	2	3	
1	138	9(10)	1	148
2	40	1	0	41
总计	178	10	1	189

注:括号内的数字为调整后列联表相应位置的数值。下同。

表 8　大小孢子长宽比的一致性及关联性

Tab. 8　Consistency and correlation analysis of *L/W* of spores

大孢子长宽比编码	小孢子长宽比编码			总计
	1	2	3	
1	146	6	0	152
2	6	18(31)	2	26
3	0	2	9	11
总计	152	26	11	189

孢子长宽比值都在 2 号编码范围物种数是 26,都在 3 号编码范围的物种数为 11。但是随着长宽比范围的增大,这种一致性的强度在递减。为了检验这种较强的一致性是否存在关联,将其转化为 2×2 列联表,计算卡方值,得到 $\chi^2 = 115.45 > \chi^2_{0.01} = 6.63$ 。因此,大小孢子长宽比存在极显著的一致性和关联性,即随着孢子长宽比增加,大型真菌物种数减少。无论大孢子还是小孢子其长宽比主要集中在 1 号编码范围,即大、小孢子的长宽比集中在 1 ~ 2 号范围内。

2.4.2　极端比与平均比的一致性及关联性　根据孢子的极端比和平均比绘制列联表(表 9)。平均比包含物种数的能力强于极端比,平均比更能说明孢子长宽比特征。平均比的 35 、120、34,极端比 84、80、25,因此,集中程度平均比(120)更能显示出孢子比值的分配情况,也就是说 189 种菌类孢子主要集中在平均比编码为 2 的区间内。同样,由于存在 0 值,将其转化为 2×3 列联表,计算卡方值得到($\chi^2 = 42.94 > \chi^2_{0.01} = 9.21$。因此,极端比和平均比存在极显著的关联性,极端比的变化会影响平均比大小。为了进一步考察这种关联性,将 2×3 列联表进一步转化为 3 个 2×2 列联表,经计算发现按照平均比编码 1 和 2、1 和 3、2 和 3 构造的 2×2 列联表卡方值分别为:22.85、37.69、8.67,均大于 $\chi^2_{0.01} = 6.63$,说明无论在哪一个数量级分类上,极端比和平均比均存在关联性。值得一提的是,平均比编码 1 和 3 构造的 2×2 列联表不仅具有极显著的关联性,而且具有较高的一致性。

表 9　孢子的极端比与平均比的一致性及关联性

Tab. 9　Consistency and correlation between extreme ratio and average ratio

极端比编码	平均比编码			总计
	1	2	3	
	1	2	3	
1	31	49	4	84
2	4	53(71)	23(30)	80
3	0	18	7	25
总计	35	120	34	189

表 10　孢子特征的各类初始凝聚点

Tab. 10　Various initial condensation points of spore characteristics

类别	孢子形态特征	孢子表面特征	大孢子长宽比	小孢子长宽比	极端比	平均比
第 1 类	1	1	1	1	1	1
第 2 类	2	2	2	2	2	2
第 3 类	2	3	3	3	3	3

表 11　*K*-means 聚类方法结果和贝叶斯判别结果的异同

Tab. 11　*K*-means and bayes analysis results

K-means 聚类	贝叶斯判别类别				
	指标	第 1 类	第 2 类	第 3 类	总体
第 1 类	物种数	150	3	0	153
	判定率/%	98.04	1.96	0.00	100
第 2 类	物种数	2	23	0	25
	判定率/%	8.00	92.00	0.00	100
第 3 类	物种数	0	0	11	11
	判定率/%	0.00	0.00	100.00	100
总体	物种数	152	26	11	189
	判定率/%	80.42	13.76	5.82	100

2.5　基于孢子多样性的聚类分析

首先根据孢子形态特征、孢子表面特征、大孢子长宽比、小孢子长宽比,孢子极端比、孢子平均比形成初始凝聚点数据集见表 10。由于孢子形态特征、表面特征及数量级长宽比的编码均为 3 个,期望分类结果为 3 类,使得分类结果具备的特点有:数量级长宽比由小到大分类;形态特征和表面特征按种内多样性增加趋势分类,因此,形成多样性低、中、高的初始凝聚点。

依据初始凝聚点数据集,采用 *K*-means 聚类方法(表 11)。第 1 类共有 153 个大型真菌物种,第 2 类共有 25 个大型真菌物种,第 3 类仅包含 11 个大型真菌物种。因此,尽管贺兰山大型野生真菌存在 189 种,但进行快速聚类只存在 34 个数据点(图 1),*K*-means 快速聚类与贝叶斯判别的错分点在闭合曲线内,形成了可对比的 34 个综合特征。各类大型真菌物种距凝聚点最大距离及类质心距离如图 1 所示。*K*-means 聚类法根据各个大型真菌样品 6 项指标(本文涉及的指标),计算 6 维空间质心点(可理解为三维空间的球心点[17])如图 2 所示。图中尽可能采用近似球状的实线进行类别区域绘制。

为检验分类效果,对其进行贝叶斯判别分析见表 11。第 1 类 153 个大型真菌物种其中 3 个应该属于第 2 类,而 *K*-means 聚类聚为第 1 类,判定的准确率为 98.04%;第 2 类 25 个大型真菌物种其中 2 个物种应该属于第 1 类, *K*-means 聚类将其聚为第 2

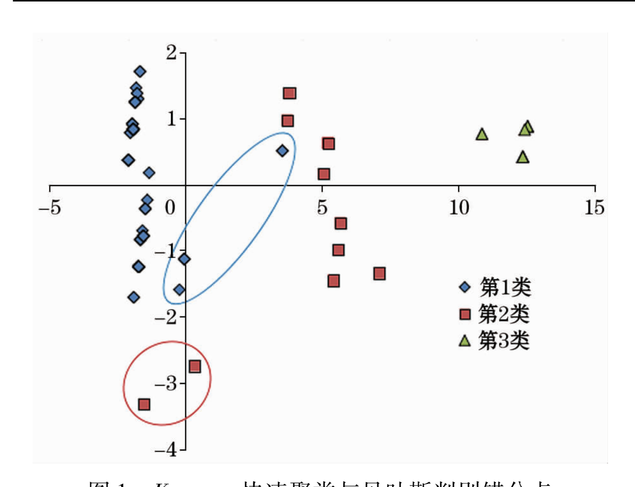
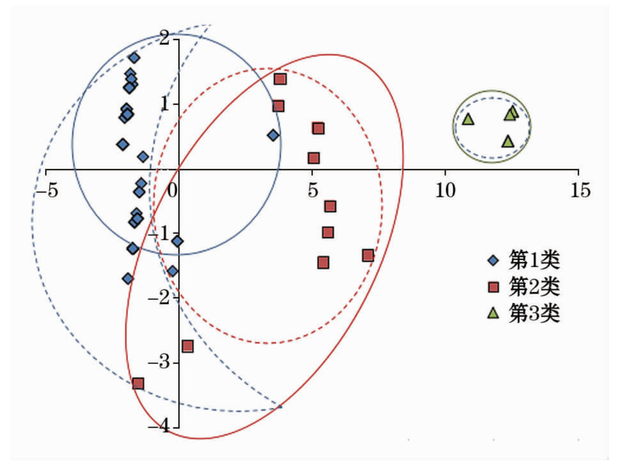


图 1　*K*-means 快速聚类与贝叶斯判别错分点

Fig. 1　Error points of *K*-means clustering and Bayesian discrimination



注：实线区域为 *K*-means 聚类结果，虚线区域为贝叶斯判别类别。

图 2　*K*-means 聚类与贝叶斯判别分析的差异

Fig. 2　The difference between *K*-means clustering and Bayesian discriminant analysis

类，判定的准确率为 92.00%；第 3 类中 11 个大型真菌物种无论是 *K*-means 聚类还是贝叶斯判别分析均归在一类，判定的准确率为 100%。误判的大型真菌物种见图 1：第 1 类错分的 3 个大型真菌物种是小亚侧耳 *Hohenbuehelia flexinis* Fr.、栎小皮伞 *Marasmius dryophilus*（Bull.：Fr.）Karst 和紫星裂盘菌 *Sarcosphaera coronaria*（Jacq. ex Cke.）Boud.，第 2 类错分的 2 个物种分别为白蜡伞 *Hygrophorus eburnesus*（Bull.：Fr.）Fr. 和亚侧耳 *Hohenbuehelia serotina*（Pers.：Fr.）Sing.，所以，实际分类结果应该是第 1 类含 152 个大型真菌种，第 2 类含 26 个大型真菌种，第 3 类不变（图 2，实线区域内）。由此可见，采用 *K*-means 聚类法基于孢子特征聚类分析可以得到至少 90% 以上的准确率。而贝叶斯判别采用判别函数进行类别划分，类似于在两类之间寻找一个超平面，这一点通过 Fisher 判别分析得到同样的结果，这个超平面的建立是基于多维均值向量进行建立的[18]。图 2 中无论是 *K*-means 聚类还是贝叶斯判别分析，都是在二维平面投影建立，所以无法呈现多维空间效果[18]。图 2 显示，189 种大型真菌按 *K*-means 聚类的第 1 类划分，153 种大型真菌只有 20 个数据点，说明 153 个大型真菌数据点投影到二维空间存在多点重合情况。第 2 类的 25 种大型真菌只有 10 个数据点，第 3 类 11 个大型真菌只有 4 个数据点。按照二维空间数据点判断多样性，多样性分别为 20/153、10/25、4/11，即 13%、40% 和 36%。

3　讨 论

3.1　大型真菌孢子形态及表面特征

孢子的形态特征和表面特征按照表 1 分类形式对孢子鉴别具有简单易行的特点，不仅能反映孢子形态及附属物特点，还显示了 189 种大型真菌孢子的表观多样性和相近程度。这种表观多样性是物种本身区别于其他物种的表观特征，更是物种本身基因多样性的表型表征[19]。由于不同菌种孢子之间可能存在相似性，同一菌种孢子也可能存在表型多样性，使得菌种孢子形态特征和表观特征的独特性降低，对于鉴别菌种很显然是不够的。由于孢子是大型真菌的繁殖体，具有相对稳定的表观特征和稳定的表观样式，其又在一定程度上表征菌种的特点，所以，孢子的形态特征和表面特征对于菌种鉴定的参考价值不能忽视。

本研究结果显示，189 种大型真菌孢子形态特征和表面特征是相互独立的，说明物种内孢子形态特征和表面特征只受物种遗传信息决定[20]，形态特征或表面特征的多样性不存在相互影响的可能性。这一结果说明采用孢子特有的形态特征和表面特征鉴别一些菌种是有科学依据的，也是简单方便的鉴别手段之一。

3.2　大型真菌孢子长宽比的一致性和关联性

供试的 189 种大型真菌孢子长度为 3.00 ~ 48.00 μm，宽度为 1.00 ~ 20.00 μm，因此，大小孢子的长宽比、孢子的极端比和平均比存在较大的变化范围，大孢子长宽比变动幅度为 1.05 ~ 16.00，小孢子长宽比变动幅度为 1.00 ~ 14.00，极端比变动幅度为 1.00 ~ 16.00，平均比变动幅度为 1.00 ~ 2.88，

平均比比较稳定。长宽比最大的菌种是黄地勺菌(*S. flavida*)，其孢子形态是棒形或线性[6]。

大孢子和小孢子长宽比编码后进行一致性和关联性分析[13]，结果显示二者之间存在一致性和关联性。虽然孢子大小不同，其长宽比是稳定的，说明大小孢子长宽比变化具有相同的变化趋势，随着长宽比的增大，物种数在减少，且大小孢子变化规律比较接近。极端比和平均比做类似分析显示，孢子长宽比均较小或者均较大时，二者存在一致性变化，其他情况只存在关联性，即极端比影响平均比的稳定。孢子的数量特征具有明显的一致性，说明孢子大小具有相对的稳定性。

3.3　聚类与判别的结果探讨

根据孢子 6 大特征的多样性，采用 *K*-means 聚类法聚类结果，将贺兰山野生大型真菌分类为 3 类，分别为 153、25 和 11 个大型真菌物种，而贝叶斯判别法聚类结果为 152、26 和 11 个大型真菌物种，存在误判的类别分别为第 1 类和第 2 类。*K*-means 聚类和贝叶斯判别分析都是在二维平面投影，这种方式是否科学，换一种投影方式是否会拥有不同的样点数分布，都值得进一步探讨和分析。但值得肯定的是部分大型真菌可以通过孢子多样性加以识别(如 2 种分析法得到的特殊数据点)，孢子的表观多样性越多，其长宽比的变化范围越大。这为大型真菌种类识别、分类、组合等提供了数量分析的依据[3]。以孢子多样性特征分类大型真菌，这只是初步探讨，随着高端科学技术和超微结构观察方法的运用，孢子的超微观形态特征进入编码，是传统分类学和现代分类的完美结合，以孢子形态划分大型真菌类型，不能完全和传统分类一致，也不能完全和分子序列相符，是否能自成体系需要进一步研究，也需要加入新的观察技术和手段。孢子形态特征结合子实体形态宏观和微观特征及分子序列共同探讨真菌的分类也是今后发展的趋势。

4　结 论

内蒙古贺兰山 189 种大型真菌按照基因 ITS 的分类分 8 目，25 科，69 属。它们的孢子在质量性状，形态特征和表面特征是相互独立的，采用孢子特有的形态特征和表面特征鉴别一些菌种是有科学依据，也是简单方便的鉴别手段之一。孢子的形态特征和表面特征对于菌种鉴定的参考价值不能忽视；孢子数量特征方面，大小孢子长宽比、孢子极端比和平均比均具有一致性和关联性特征，显示了孢子数量特征的稳定性；但菌种间孢子质量性状和数量性状具有很强的多样性，为分类提供了基本依据。按照多样性低、中、高分类，物种数分别为 152 种、26 种和 11 种，与物种分子学鉴定并不矛盾。本文所依据的孢子特征为光学显微镜下的数据，不足以全面描述孢子的特征，随着先进的观察仪器的普及使用，应该结合电子扫描电镜和透射电镜下孢子的特征进行统计分析，得到的结论会更加准确。

参考文献(References)：

[1]　Peter Roberts, Shelly Evans, 李玉, 等. 蘑菇博物馆[M]. 北京：北京大学出版社, 2017. [Peter Roberts, Shelly Evans, Li Yu, et al. The Book of Fungi[M]. Beijing: Peking University Press, 2017.]

[2]　李玉, 李泰挥, 杨祝良, 等. 中国大型菌物资源图鉴[M]. 郑州：中原农民出版社, 2015. [Li Yu, Li Taihui, Yang Zhuliang, et al. Atlas of Chinese Macrofungi Resources[M]. Zhengzhou: Central China Farmer's Publishing House, 2015.]

[3]　徐仁. 孢粉学的现状及孢子花粉分析在我国发展的展望[J]. 科学通报, 1956, 1(7): 49 − 52. [Xu Ren. Present situation of pollen and sporopollen analysis in China[J]. Scientific Bulletin, 1956, 1(7): 49 − 52.]

[4]　潘建国. 试论应用孢粉学及其新进展[J]. 微体古生物学报, 2002, 19(2): 206 − 214. [Pan Jianguo. Recent progress of appl led palynogy[J]. Acta Micropalaeontologica Sinica, 2002, 19(2): 206 − 214.]

[5]　陈因硕. 孢粉学的回顾与展望[J]. 植物学通报, 1992, 9(2): 16 − 20. [Chen Yinshuo. Review and prospect of palynology[J]. Botany Bulletin, 1999, 9(2): 16 − 20.]

[6]　王春颖. 贺兰山紫磨菇的化学成分及生物活性研究[D]. 呼和浩特：内蒙古大学, 2016. [Wang Chunying. Chemical Constituents and Biological Activities of *Cortinarius purpuurascens* in Helan Mountain[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2016.]

[7]　孙丽华, 陈立杰. 内蒙古贺兰山大型真菌图志[M]. 北京：科学技术文献出版社, 2014. [Sun Lihua, Chen Lijie. Map of Macrofungi in Helan Mountain, Inner Mongolia[M]. Beijing: Science and Technology Literature Press, 2014.]

[8]　孙丽华. 贺兰山(宁夏)大型真菌多样性及其营养成分的研究[D]. 呼和浩特：内蒙古农业大学, 2012. [Sun Lihua. Study on the Diversity of Macrofungi in Helan Mountain (Ningxia) and Their Nutritional Composition[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2012.]

[9]　孙丽华, 宋刚, 王黎元, 等. 贺兰山大型真菌生态多样性研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(4): 2219 − 2222. [Sun Lihua, Song Gang, Wang Liyuan, et al. Studies on Ecological Diversity of Macrofungi in Helan Mountain[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(4): 2219 − 2222.]

[10] 王小明,刘振生,李志刚,等. 宁夏贺兰山国家级自然保护区综合科学考察报告[M]. 银川:阳光出版社,2011. [Wang Xiaoming, Liu Zhensheng, Li Zhigang, et al. Comprehensive Scientific Investigation Report of Helan Mountain National Nature Reserve in Ningxia[M]. Yinchuan:Sun Publishing House,2011.]

[11] 刘振生,黄天兵,丁玉森,等. 内蒙古贺兰山国家级自然保护区综合科学考察报告[M]. 银川:宁夏人民出版社,2015. [Liu Zhensheng, Huang Tianbing, Ding Yusen, et al. Comprehensive Scientific Investigation Report of Helan Mountain National Nature Reserve, Inner Mongolia[M]. Yinchuan: Ningxia People's Publishing House,2015.]

[12] 王向华,刘培贵,于富强. 云南野生商品蘑菇图鉴[M]. 昆明:云南科技出版社,2004. [Wang Xianghua, Liu Peigui, Yu Fuqiang. Color Atlas of Wild Commercial Mushrooms in Yunnan [M]. Kunming:Yunnan Science and Technology Press,2004.]

[13] 孙桂燕,刘翔,李兰海. 开都河水理化性质的空间分布特征[J]. 干旱区研究,2017,34(2):259－265. [Sun Guiyan, Liu Xiang, Li Lanhai. Spatial distributions of water physicochemical properties in the Kaidu River[J]. Arid Zone Research,2017,34(2):259－265.]

[14] 高洁,李从娟,徐新文,等. 罗布泊地区引种植物生理生化指标的主成分及其聚类分析[J]. 干旱区研究,2018,35(1):199－206. [Gao Jie, Li Congjuan, Xu Xinwen, et al. Principal components and cluster analysis of physiological and biochemical indexes of introduced plants in Lopper area[J]. Arid Zone Research, 2018,35(1):199－206.]

[15] 刘红梅,霍锡敏,吕世杰. 蒙古栎秋播和嫁接育苗技术的研究[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版),2013,34(6):49－53. [Liu Hongmei, Huo Ximin, Lyu Shijie, et al. Study on autumn sowing and seedling grafting of *Quercus mongolica*[J]. Journal of Neogeozoic Agricultural University (Natural Science Edition), 2013,34(6):49－53.]

[16] 裴喜春. SAS 及应用[M]. 第 2 版. 北京:中国农业出版社,2007. [Pei Xichun, SAS and Applications[M]. 2nd Edition. Beijing:China Agriculture Press,2007.]

[17] 崔丹丹. K－Means 聚类算法的研究与改进[D]. 合肥:安徽大学,2012. [Cui Dandan. Research and Improvement of K-Means Cluster Algorithm[D]. Hefei:Anhui University,2012.]

[18] 任雪松,于秀林. 多元统计分析[M]. 第 2 版. 北京:中国统计出版社,2011. [Ren Xuesong, Yu Xiulin. Multivariate Charging Analysis[M]. 2nd Edition. Beijing:China Charging Press,2011.]

[19] Rossello R, Garcia-Valdes E, Lalucat J, et al. Genotypic and phenotypic diversity of pseudomonas stutzeri[J]. Systematic & Applied Microbiology,1991,14(2):150－157.]

[20] 周喜乐,严岳鸿,赵国华,等. 14 种剑蕨属植物的孢子形态特征及其系统分类学意义[J]. 植物科学学报,2016,34(5):669－679. [Zhou Xile, Yan Yuehong, Zhao Guohua, et al. Spore morphology of 14 species of *Loxogramme* plants and their systematic taxonomic significance[J]. Plant Science Journal,2016,34(5):669－679.]

Spore diversity of wild macrofungi in the Helan Mountains

LU Ling[1,2], YUN Xing-fu[1], LYU Shi-jie[1]

(1. *Agricultural college, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot* 010018, *Inner Mongolia, China*; 2. *Department of Biological Sciences and Technology, Baotou Teacher's College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou* 014010, *Inner Mongolia, China*)

Abstract: To investigate the diversity of wild fungi in the Helan Mountains of Inner Mongolia, over 4 000 samples were collected from the south temple and Halau Ditch located in the mountains during 2012－2016. Each of the two sampling plots was investigated. A total of 189 wild fungal species belonging to 69 genera, 25 families, and 8 orders were identified. Sporophyte morphology and spore surface characteristics and length: width ratio were analyzed. The following conclusions were obtained. Qualitative traits, such as sporophyte morphology and spore surface characteristics, were independent of one another. Quantitative traits, such as spore length: width ratio, spore extreme ratio (The ratio of megaspore length to microspore width), and average ratio (The ratio of the average megaspore length to the average microspore length), were consistent and correlated, indicating the stability of sporophyte quantitative characteristics. However, sporophyte morphology and quantitative traits were highly distinct, thus providing a basic basis for classification. Additionally, 152, 26, and 11 species showed low, middle, and high diversity, respectively.

Key words: spore morphology; wild fungi; diversity; Helan Mountains